

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 1 月 25 日 (25.01.2001)

PCT

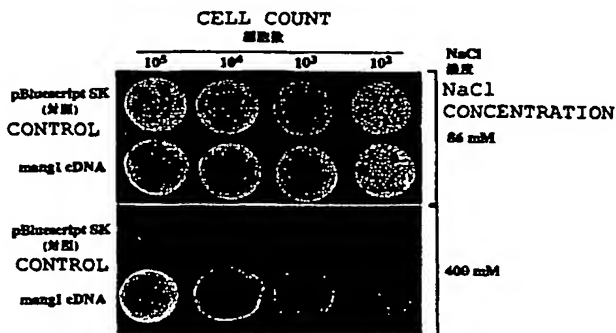
(10) 国際公開番号
WO 01/06006 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/29, C07K 14/415, 16/16, C12P 21/02, A01H 5/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04862
- (22) 国際出願日: 2000 年 7 月 19 日 (19.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/235910 1999 年 7 月 19 日 (19.07.1999) JP
特願2000/85377 2000 年 3 月 24 日 (24.03.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山田晃世 (YAMADA, Akiyo) [JP/JP]; 〒192-0371 東京都八王子市南陽台二丁目18番12号 Tokyo (JP). 小関良宏 (OZEKI, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒203-0011 東京都東久留米市大門町二丁目3番6号 302号室 Tokyo (JP). 齋藤丈夫 (SAITO, Takeo) [JP/JP]; 〒166-0012 東京都杉並区和田二丁目21番39号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (CH, DE, FR, GB).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: ENVIRONMENTAL STRESS RESISTANCE GENE

(54) 発明の名称: 環境ストレス耐性遺伝子



(57) Abstract: Resistance to environmental stress of various organisms, in particular higher plants, is elevated. A cDNA library originating in an organism highly resistant to stress (for example, mangrove) is expressed in *Escherichia coli* which is highly sensitive to stress and clones showing strengthened resistance to stress are selected. A gene thus obtained is expressed in various cells to thereby construct transformants having strengthened resistance to stress.

(57) 要約:

各種生物、特に高等植物の環境ストレスに対する耐性を向上させるものである。ストレス感受性の強い大腸菌にマングローブ等のストレス耐性の強い生物由来の cDNA ライブラリーを発現させ、ストレス耐性が強化されたクローンを選抜する。この方法で得た遺伝子を各種細胞で発現させることで、ストレス耐性が強化された形質転換細胞を作出する。



— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

環境ストレス耐性遺伝子

5 技術分野

本発明は、塩ストレス等の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA及びそのスクリーニング方法や、塩ストレス等の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質や、トランスジェニック植物などのこれらDNAやタンパク質の利用に関する。

10

背景技術

自然界に存在する生物は塩ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス等の種々の環境ストレスに曝されている。特に、塩ストレスは多くの高等植物の生育を阻害する大きな要因の1つである。高等植物の耐塩性強化は、農産物生産の増大につながるため、
15 遺伝子導入により高等植物の耐塩性を強化させる試みが、近年、活発に進められている。

例えば、H. J. Bohnerl らは大腸菌由来のマニトール合成酵素をタバコに導入することで、タバコの耐塩性が強化された事を報告している
20 (Science Vol.259, No.22, p508-510, 1993)。このような高等植物の耐塩性強化はプロリン合成系酵素 (Plant Physiol Vol.108, p1387-1394, 1995) やグリシンベタイン合成系酵素を導入することでも同様な効果が得られることが示されている (Plant J Vol. 12, p133-142, 1997, Plant Mol Biol Vol.38, 1011-1019, 1998)。しかしながら、これらの酵素をコ
25 ードする遺伝子の導入で得られる組み換え植物は、海水程度の塩水に対して十分に適応できるものではない。

一般に塩ストレス等の環境ストレスは複数の生体反応に対して悪影響をもたらす。つまり、塩濃度の高い環境で安定に生育できる遺伝子組み換え植物を作出するためには、複数の塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする遺伝子群の利用が必要となる。これまでの環境

5 ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする遺伝子群を単離するための主たる手法は、「ストレスに対抗する機構はストレスがかけられたときに発現する」という前提条件に基づいている。具体的には、環境ストレスが植物にかかったときに、特異的に発現するタンパク質や mRNA を検出し、それに対する遺伝子を分子生物学的手法によって獲得し、これをストレスに弱い植物に遺伝子導入することで、環境ストレス耐性が見られるようになるかどうかを検討するという手法が用いられてきた。確かにこれまでこのような方法によって環境ストレス特異的に誘導される遺伝子が単離されてきたが、その遺伝子を環境ストレスに弱い植物に遺伝子導入することによって、環境ストレスに強い植物体が作出された例は稀である。例えば、高い塩濃度というストレス条件下で生育する植物において、耐塩性にかかわる遺伝子はストレスの有無にかかわらず発現しているのであれば、従来の方法でストレス耐性遺伝子を見い出すことは不可能である。また、近年ストレスに強い植物種のゲノム・プロジェクトが進められているが、塩基配列あるいはアミノ酸配列がわ

10 かったところで、他のゲノム・プロジェクトにおけると同様に、その機能が不明なものが多く、どのタンパク質が環境ストレス耐性にかかわっているのかは特定できないのが現状である。

一方、沿岸及び河口近くの高濃度の塩分を含む土壤に生息する樹木類にマングローブ植物がある。マングローブ植物は進化の過程で特殊な耐

25 塩性機構を獲得したものと考えられることから、マングローブ植物の耐塩性に関わる遺伝子群を単離できれば、高等植物の耐塩性の強化への応

用が期待できる。しかしながら、マングローブ植物の耐塩性機構を遺伝子レベルで解析した例はこれまでに全く知られていない。かかる理由としては、このような樹木類から直接耐塩性に関与する遺伝子のmRNAを抽出することが極めて困難であったことが挙げられる。

- 5 近年、Mimuraらがマングローブ植物の一種である *Bruguiera sexangula* の培養細胞系を確立した (J Res Vol.110, p25-29, 1997)。この培養細胞は懸濁培養が可能であり、また塩濃度 150 mM以上の環境下でも安定に生育することができるといった、他の植物培養細胞とは異なる極めて特異的な性質を有している (J. Plant Res Vol.110, p31-36, 1997)。
- 10 しかしながら、この培養細胞を利用してマングローブ植物の cDNA ライブラリーを構築し、マングローブ植物の耐塩性に関わる遺伝子群を探索しようとする試みさえも、これまで全く検討されていない。また、その他の塩生植物由来の遺伝子を導入することで高等植物の耐塩性を強化した例もほとんどなく、塩生植物の一種であるアイスプラント
- 15 (*Masembryanthenum crystallinum*) 由来のイノシトールメチルトランスフェラーゼ遺伝子をタバコに導入することで、形質転換細胞内に適合溶質の一種であるオノニトールの含有量を増大させ、これによりタバコの耐塩性を強化した例 (Plant Physiol Vol. 115, p1221-1219, 1998) や、比較的耐塩性が高い大麦由来のストレス誘導性タンパク質 (LEAタン
- 20 パク質) をコードする遺伝子をイネに導入することで、イネの耐塩性をわずかに向上させた例 (Plant Physiol Vol. 110, p249-257, 1996) が代表的な例であるといえる。このように、塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする遺伝子群を効率よく単離する技術が確立されていないため、マングローブ植物群をはじめとした、多くの塩生植物
- 25 の環境ストレス耐性遺伝子に関する研究が十分に行われてきたとは言い難いのが現状である。

また、塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を人為的に改変することにより、タンパク質の塩ストレス耐性を向上させる機能を強化させることができれば、より強力な塩ストレス耐性植物を作出することが可能になる。大腸菌由来のコリンデヒドロゲナーゼを植物で発現させるときに、一部のコドンを改変することで、植物内でのコリンデヒドロゲナーゼ発現量を安定化させ、これによりコリンデヒドロゲナーゼの代謝産物であるグリシンベタイン（適合溶質の一種、植物の耐塩性を高める働きがある）レベルを安定化させる試みがなされている（Stress responses of photosynthesis organisms (ed. Satoh K., Murata N.) pl15-131, Elsevier Science, Amsterdam) が、これはタンパク質のアミノ酸配列を変化させたものではない。アミノ酸配列を改変（改良）した塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質を導入することにより、高等植物の塩ストレス耐性を強化した例はこれまで報告されていない。そして、耐塩性に関与する遺伝子やその改変遺伝子は塩ストレスのみならず、その他の環境ストレス（熱、凍結、浸透圧、乾燥、紫外線）の全て、あるいはそれらのうちのいくつかのストレスに対する耐性を向上させる活性を有する可能性が期待できる。

発明の開示

本発明の課題は、各種生物の環境ストレスに対する耐性を強化する効果を有する遺伝子の効率のよいスクリーニング方法や、かかるスクリーニング方法により得られる環境ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質（環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質）の遺伝子や、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質や、耐塩性が増強されたトランスジェニック植物等を提供することにある。

上記の課題を解決するため、本発明者らは塩生植物の一種であるマン

グローブに着目し、既に培養細胞系が確立されている *Bruguiera sexangula* の培養細胞の分与を得て、この細胞株を 100 mM の NaCl 存在下で培養し、培養細胞から抽出した mRNA を基に cDNA ライブラリーを作製し、この中からマングローブの耐塩性に関与する遺伝子の探索を試みた。通常、耐塩性関連遺伝子をスクリーニングする方法としては、ディファレンシャルスクリーニング法が広く利用されている(塩ストレスにより誘導される新規チオニン遺伝子に関する特開平 10-295380 号公報参照)が、このスクリーニング方法で単離される遺伝子は、ストレス条件下で特異的に誘導される遺伝子であり、その遺伝子を他の細胞で発現させることでその細胞のストレス耐性を強化できるとは限らない。そこで、本発明者らはストレス耐性に関与する遺伝子の探索に大腸菌の遺伝子発現系を利用する方法を新たに開発した。

大腸菌の遺伝子発現系を利用して、耐塩性に関与する遺伝子をスクリーニングする場合、大腸菌自身の塩化ナトリウム (NaCl) に対する防御機構が強く働くことが問題になる。現在、分子生物学の分野で広く利用されている DH5 α 、HB101、JM109 等の大腸菌は 1000 mM 以上の NaCl を含む 2YT 寒天培地でもコロニー形成能を有する。これらの株を用いて上記のスクリーニングを行った場合、上記 cDNA ライブラリー由来の候補 cDNA の発現により耐塩性が強化されたクローンの他に、大腸菌自身の耐塩性機構が強力に働くことで耐塩性に全く関与しない cDNA が導入されたクローンも得られてしまうことになり、これら両者の明確な判別は極めて困難である。このような理由から、大腸菌の遺伝子発現系を利用して耐塩性関連遺伝子の選抜はこれまで全く行われていなかった。本発明者等は、他の大腸菌と比べ、耐塩性機構の働きが低下した大腸菌を見い出し、これを利用することで、初めて大腸菌を利用した耐塩性関連遺伝子のスクリーニングを行なうことに

成功した。

本発明者らによる上記方法で単離したマングローブ等の塩性植物由来の遺伝子（cDNA）群は、それぞれ大腸菌の耐塩性を強化する機能を有することが確認された。植物遺伝子を異種生物である大腸菌で発現させて、該大腸菌の耐塩性を向上させることができたため、これらの遺伝子群は、原核生物から真核生物にいたる幅広い生物群で、耐塩性を強化する機能を有するものと考えられた。実際、本発明者らは、m a n g l 遺伝子と命名した単離したストレス耐性に関与する遺伝子群の中の1つの遺伝子を導入することにより、酵母、植物細胞（タバコ培養細胞）、そして植物体（タバコ）の耐塩性を強化させることにも成功した。また、m a n g l は耐塩性の他に、熱、浸透圧、凍結等の環境ストレスに対する耐性を強化する機能を有することも確認された。さらに、m a n g l cDNAにランダムな変異を導入し、この変異cDNAを大腸菌に導入し、変異前の選択条件より厳しい条件下で選抜する工程を1又は2回以上繰り返すことにより、より強い耐塩性向上活性を有するタンパク質を得ることができることを見い出した。本発明はかかる一連の研究に基づいて完成するに至ったものである。

すなわち本発明は、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAをスクリーニングする方法であって、cDNAライブラリー由来の候補cDNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補cDNAを単離することを特徴とするスクリーニング方法（請求項1）、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAをスクリーニングする方法であって、cDNAライブラリー由来の候補cDNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生

できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補 c D N A を単離し、単離された候補 c D N A にランダムな変異を導入し、この変異 c D N A を宿主細胞に導入し、変異前の c D N A の選択条件より厳しい条件下で選抜する工程

5 を 1 又は 2 回以上繰り返すことを特徴とするスクリーニング方法（請求項 2）、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上のストレスであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のスクリーニング方法（請求項 3）、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項 3 記載のスクリーニング方法（請求項 4）、宿主細胞が、大腸菌であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載のスクリーニング方法（請求項 5）、大腸菌が、S O L R 株であることを特徴とする請求項 5 記載のスクリーニング方法（請求項 6）、宿主細胞が実質的に生育できない

10 環境条件下が、350 mM 以上の塩濃度の条件下であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 記載のスクリーニング方法（請求項 7）に関する。

また本発明は、請求項 1 ～ 7 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とする環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする D N A （請求項 8）、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上のストレスであることを特徴とする請求項 8 記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする D N A （請求項 9）、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする

20 請求項 9 記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする D N A （請求項 10）、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク

25

ドするDNA（請求項10）、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質が、植物由来のタンパク質であることを特徴とする請求項8～10のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項11）、植物が、オヒルギ（*Bruguiera sexangla*）、

5 ヒルギダマシ（*Avicennia marina*）、シチメンソウ（*Sueada japonica*）、オカヒジキ（*Salsola komarovii*）又はアイスプラント（*Mesembryanthemum crystallinum*）であることを特徴とする請求項11記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項12）、以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質、(c)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から

10 なり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項13）、配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項14）、請求項14記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項15）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求

20 項16）、配列番号3に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項17）、請求項

1 7 記載の DNA とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA (請求項 18)、以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA (a)配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタン

5 パク質、(b)配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 19)、配列番号 5 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA (請求項 20)、請求項 20

10 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA (請求項 21)、以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA (a)配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、

15 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 22)、配列番号 7 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA (請求項 23)、請求項 23 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジेंटな条件下

20 でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA (請求項 24)、以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA (a)配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号 10 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加

25 されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 25)、配列番号 9 に示される塩基配列若

しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項26）、請求項26記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項27）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項28）、配列番号11に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項29）、請求項29記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項30）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号14に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項31）、配列番号13に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項32）、請求項32記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項33）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号16に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号16に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され

たアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 3 4）、配列番号 1 5 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA（請求項 3 5）、請求項 3 5 記載の遺伝子を構成する DNA とストリン

5 ジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 3 6）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA(a)配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、

10 置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 3 7）、配列番号 1 7 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA（請求項 3 8）、請求項 3 8 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少な

15 くとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 3 9）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA(a)配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、

20 かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 4 0）、配列番号 1 9 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA（請求項 4 1）、請求項 4 1 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク

25 質をコードする DNA（請求項 4 2）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA(a)配列番号 2 2 に示されるアミノ酸

配列からなるタンパク質、(b)配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 4 3）、配列番号 2 1 に示される塩基配列若しくは

5 その相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA（請求項 4 4）、請求項 4 4 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 4 5）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA (a)配列番号 2

10 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 4 6）、配列番号 2 3 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは

15 全部を含む DNA（請求項 4 7）、請求項 4 7 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 4 8）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA (a)配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

20 (b)配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 4 9）、配列番号 2 5 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA（請求項 5 0）、請求項 5 0 記載

25 の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコ

ードするDNA（請求項51）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号28に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号28に示されるアミノ酸配列において、

5 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項52）、配列番号27に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項53）、請求項53記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を

10 有するタンパク質をコードするDNA（請求項54）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号30に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号30に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向

15 上活性を有するタンパク質（請求項55）、配列番号29に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項56）、請求項56記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項5

20 7）、以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号32に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号32に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項58）、配列

25 番号31に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項59）、請求項59記載の遺

伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項60）、以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号34に示されるアミノ酸配列からなる

5 タンパク質、(b)配列番号34に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項61）、配列番号33に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項62）、請

10 求項62記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項63）、以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62

15 又は64に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求

20 項64）、配列番号35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61又は63に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項65）、請求項65記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性

25 向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項66）に関する。

また本発明は、請求項 8 ～ 6 6 のいずれか記載の DNA を用いることを特徴とする環境ストレス耐性の向上方法（請求項 6 7）、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上のストレスであることを特徴とする請求項 6 7 記載の環境ストレス耐性の向上方法（請求項 6 8）、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項 6 8 記載の環境ストレス耐性の向上方法（請求項 6 9）に関する。

また本発明は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 7 0）、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と相同性が 7 0 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 7 1）、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 7 2）、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 7 3）、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 7 4）、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 7 5）、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 7 6）、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 7 7）、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタ

- ンパク質（請求項 78）、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 79）、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有する
- 5 タンパク質（請求項 80）、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 81）、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 82）、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 83）、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 84）、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 85）配列番号 16 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 86）、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 87）、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 88）、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 89）、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 90）、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 91）、配列番号 22 に示されるアミ
- 10
- 15
- 20
- 25

ノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項92）、配列番号24に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項93）、配列番号24に示されるア

5 ミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項94）、配列番号26に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項95）、配列番号26に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項96）、配列番号28に示されるア

10 ミノ酸配列からなるタンパク質（請求項97）、配列番号28に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項98）、配列番号30に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項99）、配列番号30に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項100）、配列番号32に示さ

15 れるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項101）、配列番号32に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項102）、配列番号34に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項103）、配列番

20 号34に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも

25

塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 1 0 4）、配列番号 3 6， 3 8， 4 0， 4 2， 4 4， 4 6， 4 8， 5 0， 5 2， 5 4， 5 6， 5 8， 6 0， 6 2 又は 6 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 1 0 5）、配列番号 3 6， 3 8， 4 0， 4 2， 4 4， 4 6，
5 4 8， 5 0， 5 2， 5 4， 5 6， 5 8， 6 0， 6 2 又は 6 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項 1 0 6）に関する。

また本発明は、請求項 7 0 ～ 7 2 のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項 1 0 7）、請求項 7 3 ～ 1 0 4 のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項 1 0 8）、請求項 1 0 5 又は 1 0 6 記載のタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項 1 0 9）、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 0 7 ～ 1 0 9 のいずれか記載の抗体（請求項 1 1 0）に関する。

15 また本発明は、請求項 8 ～ 1 2 のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA を含むことを特徴とするベクター（請求項 1 1 1）、請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか記載の DNA を含むことを特徴とするベクター（請求項 1 1 2）、請求項 1 6 ～ 6 3 のいずれか記載の DNA を含むことを特徴とするベクター（請求項 1 1 3）、請求項 6 4 ～ 6 6 のいずれか記載の DNA を含むことを特徴とするベクター（請求項 1 1 4）に関する。

また本発明は、請求項 1 1 1 ～ 1 1 4 のいずれか記載のベクターを宿主細胞に導入することにより得られることを特徴とする形質転換細胞（請求項 1 1 5）、宿主細胞が、植物細胞であることを特徴とする請求
25 項 1 1 5 記載の形質転換細胞（請求項 1 1 6）、請求項 1 1 5 又は 1 1 6 記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞又はその培養液の上清

から組換えタンパク質を回収することを特徴とする環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の製造方法（請求項 1 1 7）に関する。

また、本発明は、請求項 8 ～ 1 2 のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA を植物細胞に導入し、

5 該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物（請求項 1 1 8）、請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか記載の DNA を植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物（請求項 1 1 9）、請求項 1 6 ～ 6 3 のいずれか記載の DNA を植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物（請求項 1 2 0）、請求項 6 4 ～ 6 6 のいずれか記載の DNA を植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物（請求項 1 2 1）、請求項 1 1

15 1 ～ 1 1 4 のいずれか記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物（請求項 1 2 2）、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上のストレスであることを特徴とする請求項 1 1

20 8 ～ 1 2 2 のいずれか記載のトランスジェニック植物（請求項 1 2 3）、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項 1 2 3 記載のトランスジェニック植物（請求項 1 2 4）、請求項 1 1 8 ～ 1 2 2 のいずれか記載のトランスジェニック植物に由来することを特徴とする繁殖材料（請求項 1 2 5）に関する。

25

図面の簡単な説明

第1図は、m a n g 1を導入された大腸菌（S O L R）の耐塩性を検出した結果を示す。検出は、コロニー形成を指標に行なった。対照としてベクターのみ（pBluescript SK）を用いた。2つの塩（N a C l）濃度で検定を行なった。

第2図は、m a n g 1の各種部分配列を導入された大腸菌（S O L R）の耐塩性を検出した結果を示す。検出は、コロニー形成を指標に行なった。対照としてベクターのみ（pBluescript SK）を用いた。2つの塩（N a C l）濃度で検定を行なった。カッコ内に示した数値はアミノ酸番号を示し、「*」はコード領域および非コード領域を含んだm a n g 1のc D N Aを指す。

第3図は、m a n g 1を導入された酵母の高塩条件下における生育を経時的に計測した結果を示す図である。検出は細胞濃度を指標に行なった。対照としてベクターのみ（p Y E S 2）を用いた。2つの塩（N a C l）濃度で検定を行なった。

第4図は、m a n g 1を導入されたタバコ培養細胞の高塩条件下における生育を検出した結果を示す図である。検出は湿重量を指標に行なった。対照としてベクターのみ（G U S）を用いた。3つの塩（N a C l）濃度で検定を行なった。

第5図は、m a n g 1を導入されたタバコ植物体の高塩条件（150 mMのN a C l）下における生育を検出した結果を示す図である。A, Cは、対照としてベクターのみ（G U S）を導入したタバコ、B, Dは、m a n g 1を導入したタバコを示す。

第6図は、m a n g 1を導入された大腸菌（S O L R）の熱ストレス耐性を検討した結果を示す。熱ストレス耐性は40℃培養における生育曲線を指標に評価した。対照としてベクターのみ（pBluescript SK）を

導入した SOLR を用いた。

第 7 図は、m a n g l を導入された大腸菌 (SOLR) の浸透圧耐性を検討した結果を示す。浸透圧耐性は 800 mM のソルビトールを含む 2 Y T 寒天培地上における生育を指標に評価した。対照としてベクターのみ (pBluescript SK) を導入した SOLR を用いた。

第 8 図は、m a n g l を導入された大腸菌 (SOLR) の凍結ストレス耐性を検討した結果を示す。凍結ストレス耐性は凍結融解処理を施した菌体の 2 Y T 寒天培地上における生育で評価した。対照としてベクターのみ (pBluescript SK) を導入した SOLR を用いた。

10 第 9 図は、m a n g l 最小機能領域と考えられる領域 (mangl core)、及びそれに変異を導入したクローンの塩基配列、アミノ酸配列を示す。塩基配列、及びアミノ酸配列中における反転文字は変異があった箇所を示す。

15 第 10 図は、m a n g l 最小機能領域と考えられる領域及びそれに変異を導入したクローンの 85 mM、350 mM、500 mM の NaCl を含む寒天培地上における生育結果を示す。対照としてベクターのみ (pBluescript SK) を導入した SOLR を用いた。

発明を実施するための最良の形態

20 本発明の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA のスクリーニング方法としては、cDNA ライブラリー由来の候補 cDNA を宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補 cDNA を単離する
25 スクリーニング方法であれば、特に制限されるものではない。このスクリーニング方法はこの方法で得られた環境ストレス耐性向上活性を有す

るタンパク質の機能強化にも利用できる。すなわち、本発明の他の態様の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAをスクリーニングする方法として、cDNAライブラリー由来の候補cDNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補cDNAを単離し、単離された候補cDNAにランダムな変異を導入し、この変異cDNAを宿主細胞に導入し、変異前のcDNAの選択条件より厳しい条件下で選抜する工程を1又は2回以上繰り返すことを特徴とするスクリーニング方法を挙げることができる。

上記の、一次スクリーニングの結果得られた遺伝子断片にランダムな変異を導入したものを作製し、この中からこの遺伝子がスクリーニングされた条件より厳しい条件で選抜することを繰り返すことで、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の機能向上を図る方法における、任意の遺伝子断片に対してランダムな変異を導入する方法としては、PCRを利用する方法が一般的であり、例えば、PCR反応溶液にマンガンを追加することで、fidelityを低下させる方法（A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology Vol1, p11-15(1989)、Yeast Vol18, p79-82(1992)）が最も簡便である。また、この他のランダムミューテーションの方法として、DNA shuffling（Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 91, p10747-10751, 1994）を用いることもできる。

上記環境ストレスとしては、環境要因に基づくストレスであればどのようなストレスでもよく、具体的に、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレス等を例示することができ、これら環境ストレスは、単独要因に基づくストレスであっても、複数の

要因に基づくストレスであってもよい。また、化学物質ストレスとしては、化学物質に起因するストレスであれば特に制限されるものではないが、塩ストレスや毒性物質ストレスを例示することができる。

上記 cDNA ライブラリーとしては、環境ストレスに関与する遺伝子の cDNA が含まれるものであれば、植物・動物・微生物等由来する生物種など特に制限されるものではない。例えば、塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA をスクリーニングする場合、塩生植物、例えば、マングローブ（ハマザクロ、オヒルギ、メヒルギ、ヤエヤマヒルギ、ヒルギモドキ、ヒルギダマシ、ニッパヤシ）、マツバギク、シチメンソウ、ウラギク、アッケシソウ、マツナ、ハマアカザ等の生物種より調製した cDNA ライブラリーを用いることができる。また、cDNA ライブラリーの調製方法としては、当業者に公知の方法であればどのような方法でもよい。例えば、実施例記載のように、細胞からの全 mRNA の抽出は、Ostrem らの方法（Plant Physiol Vol.84, p1270-1275, 1987）に従って調製することができ、また、調製した mRNA からの poly (A) + RNA の精製は、Oligotex-dT 30 <super>（第一化学社）を用いて行なうことができる。cDNA ライブラリーは、精製した poly (A) + RNA を基に、ZAP-cDNA/Gigapack Cloning Kit（Stratagene 社）を利用して構築することができる。

上記 cDNA ライブラリーに由来するスクリーニング対象となる候補 cDNA が導入される宿主細胞としては、細菌や酵母等の微生物細胞や、動植物細胞を例示することができるが、宿主-ベクター系に関する知見が確立している大腸菌、枯草菌、サッカロミセス・セルビッシェ、BHK 細胞等の動物細胞などが好ましく、中でもかかる知見が豊富で、生育が早く、取り扱いが容易な大腸菌が好ましい。また、宿主細胞としては、

cDNAライブラリー由来の候補cDNAが導入された形質転換細胞は生育しうる環境条件下において、実質的に生育できない細胞、例えば塩感受性細胞や、熱塩感受性細胞等が好ましく、かかる細胞は野生株からのスクリーニングにより、あるいは野生株を変異処理することにより調

5 製することができる。

次に、形質転換細胞は、上記宿主細胞へcDNAライブラリー由来の候補cDNAを導入することによって行われるが、かかる導入方法としてはトランスフォーメーション法、エレクトロポレーション法など公知の遺伝子導入方法であれば特に制限されるものではない。そして、候補

10 cDNAが導入された形質転換細胞は、前記宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下、例えば、高塩濃度条件下、高温条件下、乾燥条件下で培養される。続いて、培養後に生育しているクローンが公知の方法により選択され、選択されたクローンから導入した候補cDNAが公知の方法により単離することができる。

15 本発明のスクリーニング方法を、以下、環境ストレスが塩ストレスであり、宿主細胞が大腸菌である場合を例に挙げてより具体的に説明する。宿主細胞として用いられる大腸菌としては、耐塩性機構の働きが低下した大腸菌が好ましく、塩に対する最小生育阻害濃度が低い大腸菌がより好ましい。例えば、750mM以上、好ましくは500mM以上、より

20 好ましくは350mM以上のNaClを含む培地中でコロニー形成が抑制される大腸菌を用いることが、耐塩性関連遺伝子のスクリーニング効率を向上させることができるので好ましい。かかるNaCl感受性の大腸菌として、低濃度の塩（350mM以上のNaCl）を含む寒天培地上でほとんど生育できないことが本発明者らにより見いだされた大腸菌

25 の一種であるSOLR株（TOYOBO社、Stratagene社、理研ジーンバンク等から市販されている）を具体的に挙げるることができる。このSOL

R株を用いる場合、候補cDNAの導入は、前記 ZAP-cDNA/Gigapack Cloning Kit (Stratagene 社) に含まれている SOLR株と ExAssist helper phage による in vivo excision system を利用することができ、これらの操作は全て上記のキットの手引き書に従うことで容易に行うことができる。

このようにして得られた候補cDNAが導入された SOLR株を、約 400 mMの NaCl を含む培地で培養を行ない、生育した細胞を選択することにより、耐塩性タンパク質をコードするDNAで形質転換されたクローンを選抜することができる。かかるクローンの選抜は、例えば、寒天培地等で 37℃で 8～20 時間培養し、寒天培地上に形成されるコロニーを選択すればよい。選抜されたクローンからの cDNA の単離は、例えば、文献 (Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1987))) に示された方法により、プラスミドDNAを抽出することにより行うことができる。

また、目的とする形質転換大腸菌を得るためのスクリーニングは、複数回繰り返して行なうこともできる。例えば、cDNAライブラリーが導入された大腸菌を、まず、最小生育阻害濃度の塩を含む培地で培養して、この条件で生育するクローンを選抜する (一次スクリーニング)。次いで、選抜したクローンから cDNA を単離し、これを大腸菌に再度導入して、最小生育阻害濃度よりも高い塩を含む培地で該大腸菌を培養し、この条件で生育するクローンを選抜する (二次スクリーニング)。このようにスクリーニングを繰り返すことで、塩耐性関連遺伝子の単離の効率を高めることができる。また、前記のように、単離された cDNA にランダムな変異を導入した変異 cDNA を用いて二次スクリーニングを行うこともできる。

本発明の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする

DNAは、上記スクリーニング方法により得られるDNAであれば特に制限されるものではなく、例えば、塩ストレス等の化学物質ストレス、熱ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスなどの1又は2以上のストレスに対する耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。そして特に、塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAとしては、植物由来、好ましくはオヒルギ(*Bruguiera sexangula*)等の塩性植物由来のDNAを例示することができる。そして、マングローブ由来の塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列表の配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11又は13に示される塩基配列を有するDNAを具体的に例示することができ、また、アイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)由来の塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列表の配列番号15, 17, 19, 35, 63に示される塩基配列を有するDNAを、シチメンソウ(*Suaeda japonica*)由来の塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列表の配列番号21, 37, 39, 51, 53, 57に示される塩基配列を有するDNAを、オカヒジキ(*Salsola komarovii*)由来の塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列表の配列番号23, 25, 41, 47, 49, 59, 61に示される塩基配列を有するDNAを、ヒルギダマシ(マングローブの一種、*Avicennia marina*)由来の塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列表の配列番号27, 29, 31, 33, 43, 43, 55に示される塩基配列を有するDNAを、それぞれ具体的に例示することができる。

本発明のDNAとしては、上記配列表の配列番号に示される塩基配列

若しくはそれらの相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNAや、かかるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAや、配列表の配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAや、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAや、配列表の配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。これらのDNAを各種生物に導入することで耐塩性等が強化されたという報告はこれまでになく、本発明者等により初めて見出されたものである。

本発明のタンパク質としては、配列表の配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質や、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質や、配列表の配列番号2, 4, 6, 8, 1

0, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30,
32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52,
54, 56, 58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列におい
て、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ
5 酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタン
パク質を挙げることができる。

上記配列番号8, 14, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48,
50, 52, 54, 56, 58, 60, 62又は64に示したアミノ酸
配列は、タンパク質の全長をコードしたものではないと考えられるが、
10 それ自体に塩ストレス耐性を強化させる活性が存在したため、それぞれの
全長タンパク質の機能領域であるといえる。本発明は、上記のように、
これら機能領域を含む全長タンパク質および該全長タンパク質をコード
するDNAを含むものである。そして、部分長cDNAを基に全長cD
NAを単離する方法としては、例えば、Marathon cDNA Amplification Kit
15 (Clontech社)、3'-Full RACE Core Set(宝酒造社)、5'-Full RACE
Core Set(宝酒造社)等のキットを用い、それらの手引き書に従うのが
適当である。

上記のように、本発明には、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12,
14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34,
20 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56,
58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAが包含される。一般に、
生理活性を有するタンパク質で、少数のアミノ酸が置換、欠失、挿入が
あっても、その生理活性が維持される場合があることはよく知られてお
り、また、タンパク質中のアミノ酸を変異させる公知の種々の方法もよ
25 く知られている上に、既にいくつかのキットも市販されている。例えば、

変異を導入したプライマーを合成し、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社)を用いれば容易にタンパク質中のアミノ酸を変異させることが可能である。

また、上記のように、配列番号 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 又は 64 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質であっても、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の少なくとも塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性を強化する活性を有すれば、それらは全て本発明の範囲に含まれる。

また、配列番号 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 又は 64 に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA は、ハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術 (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) によっても調製することが可能である。例えば、配列番号 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 又は 64 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 又は 63 に示される塩基配列の全部若しくは一部をプローブとして、各種生物

由来のDNAライブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、目的とする少なくとも塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA等を得ることができる。

このようなDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む洗浄バッファーによる42℃での洗浄処理を挙げることができる、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む洗浄バッファーによる65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせて、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

また、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61又は63に示される塩基配列の情報を基に調製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして各種生物由来のDNA（またはRNA）を鋳型にポリメラーゼ連鎖反応を行なうことによっても、目的とする少なくとも塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA等を得ることができる。本発明には、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の少なくとも塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性を強化する活性を有する限り、このようなハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術を利用して単離するDNAも含まれる。

上記配列番号 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 又は 64 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、上記配列番号に示されるアミノ酸配列とそのアミノ酸配列において高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性をいう。本発明には、前記のように、このように上記配列番号に示されるアミノ酸配列とそのアミノ酸配列において高い相同性を有し、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の少なくとも塩ストレス耐性を強化する活性を有するタンパク質をコードするDNAが含まれる。例えば、配列番号2のアミノ酸配列は1から86番目のアミノ酸を含む領域が塩ストレス耐性を強化する活性を有することから、例えばこの領域を含むアミノ酸配列をコードする遺伝子DNAは全て本発明の範囲に含まれる。配列の相同性は、例えば、遺伝情報処理ソフトウェアの GENETYX-MAC（ソフトウェア開発株式会社）のマルチアライン機能を利用することにより決定できる。

本発明の環境ストレス耐性の向上方法としては、上記本発明のDNA、すなわち塩ストレス等の化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上の環境ストレスに対する耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードするDNAを用いる方法であれば特に制限されるものではなく、この環境ストレス耐性の向上方法により、植物・動物及びそれらの組織、器官、細胞並びに細菌、酵母、カビ等の微生物の環境ストレス耐性を向上させることができる。

本発明の塩ストレス等の化学物質ストレス、熱ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスなどの1又は2以上の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体としては、前記本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体であればどのようなものでもよく、かかる抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質や、配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質や、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質を抗原として用いて作製することができる。これら抗体は、例えば、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

上記環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコールを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に該環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質又はエピトープを含む断片、類似体若しくは細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたら

す、ハイブリドーマ技法 (Nature 256, 495-497, 1975)、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Immunology Today 4, 72, 1983) 及びEBV-ハイブリドーマ技法 (MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc.,1985)など任意の技法を用いることができる。

本発明の上記環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法 (米国特許第 4,946,778号) を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニック植物又はトランスジェニック動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。

本発明のベクターとしては、塩ストレス等の化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスなど前記環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAを含むベクターであれば特に制限されるものではない。また、本発明の形質転換細胞としては、かかるベクターを植物細胞等の宿主細胞に導入することにより得られるものであれば特に制限されるものではない。そしてまた、本発明の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の製造方法としては、上記本発明の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞又はその培養液の上清から組換えタンパク質を回収する方法であれば特に制限されるものではない。さらに、本発明のトランスジェニック植物としては、前記環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA又は前記ベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られるものであれば特に制限されるものでは

ない。以下、上記本発明のベクター、形質転換細胞、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の製造方法、及びトランスジェニック植物について説明する。

上記のように、本発明のDNAは組換えタンパク質の調製に利用することができる。組換えタンパク質の調製は、上記本発明のDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入して、該DNAを発現させ、次いで、発現させたタンパク質を該形質転換細胞又はその培養上清から回収することにより行うことができる。組換えタンパク質の発現に用いられる宿主-ベクター系としては、例えば、

5 IMPACT-CN System (宿主: E. coli strain ER2566、ベクター: pTYB1、pYB2、pYB11、pYB12 (BioLabs社))、あるいは pET Expression System (宿主: Epicurian Coli BL21、ベクター: pET3 シリーズ (Novagen社)) が挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入法としては、当業者に公知の方法、例えば、エレクトロポレーション法やヒートショック

10 法が挙げられる (遺伝子ライブラリーの作製法、羊土社 (1994)、植物細胞工学入門、学会出版センター (1998))。また、組換えタンパク質を発現させるための形質転換体の培養は、当業者に一般的に用いられている方法および条件にて行なうことができる。発現させたタンパク質は、例えば、IMPACT-CN Systemを利用した場合にはキチンビーズ (BioLabs社) で、pET Expression Systemを利用した場合には His Bind Resin (Novagen社) により精製できる。

15 20

上記本発明のDNAは、また、少なくとも塩ストレス耐性が強化されたトランスジェニック生物の作出に利用できる。本発明のDNAを用いてトランスジェニック生物を作出する生物種としては特に限定されるものではないが、用いる遺伝子がマングローブに由来する場合には、高等植物であることが好ましい。かかるトランスジェニック植物の作出は、

25

該DNAを植物細胞内でその発現を保証するベクターに挿入し、これを植物細胞に導入し、トランスジェニック植物を得るために該形質転換植物細胞を再生させることにより有利に行うことができる。

トランスジェニック植物の作出に用いられるベクターとしては、例えば、東洋紡から市販されている pBI101、あるいは pIG121Hm (Plant J, Vol 6, p271-282 (1994)) を好適に用いることができる。ベクターを導入する植物細胞の種類に特に制限はないが、例えばイネ、小麦、トウモロコシ、大豆、タバコ、ニンジン等が考えられる。植物細胞の形態としては、例えば、プロトプラスト、カルス、植物体の部分(リーフディスク、ヒポコチル等)がある。宿主植物細胞へのベクターの導入法としては、アグロバクテリウム法が好適であるがその他にも、例えば、ポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などを用いることができる(モデル植物の実験プロトコール、秀潤社(1996))。

ベクターの導入された植物細胞を植物体へ再生させる方法は、植物種により異なる。例えば、イネの場合、以下のようにして行なうことができる。完熟種子からカルス誘導を行い、これにcDNAを導入したアグロバクテリウムを感染させる。共存培養を経て、選抜培地に移し培養する。約3週間後カルスを再分化培地に移し、再分化するまで培養する。4、5日馴化させた後ポットに移すことで形質転換体を再生させる(モデル植物の実験プロトコール、秀潤社(1996))。また、ニンジン、タバコ等の再生の方法としては、それぞれ加藤、庄野博士等の方法(植物組織培養の技術 朝倉書店(1983))が適当である。

本発明のトランスジェニック植物に由来する繁殖材料としては、上記トランスジェニック植物体由来する繁殖材料であればどのようなものでもよく、例えば、植物の種類に応じて、種子、塊根、切穂、メリクローン等の培養増殖材料を挙げることができる。また、かかる繁殖材料を

基に本発明のトランスジェニック植物を量産することが可能である。

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1 マングローブ及びその他の塩生植物の cDNA ライブラリー 5 の作製

マングローブ懸濁培養細胞は、Mimura らが確立した *Bruguiera sexangula* の懸濁培養細胞系 (J Plant Res Vol.110, p25-29 (1997)) を用いた。この培養細胞は 100 mM の NaCl を含む AA 培地を用い、500 ml フラスコに 120 ml の分量で、26℃、暗所で往復振とう
10 培養 (70 rpm) した。マングローブの cDNA ライブラリーは、この懸濁培養細胞を用い、以下に示す手順で行った。まず、Ostrem らの方法 (Plant Physiol Vol.84 p1270-1275 (1987)) に従って全 mRNA を抽出し、ここから Oligotex-dT30<super> (第一化学社) を用い poly (A) + RNA を精製した。精製した poly (A) + RNA を基
15 に cDNA を合成し、λ Zap II (Stratagene 社) ラムダファージベクターに導入して cDNA ライブラリーを構築した。λ Zap II を用いた cDNA ライブラリーの構築方法は周知の方法であり、実際の手順は Stratagene 社の手引き書に従った。その結果、 10^6 の独立クローンを含むマングローブ cDNA ライブラリーの構築に成功した。また、
20 その他の塩生植物であるヒルギダマシ (マングローブの一種、*Avicennia marina*)、シチメンソウ (*Suaeda japonica*)、オカヒジキ (*Salsola komarovii*)、アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) の cDNA ライブラリーを作成するための材料にはそれぞれの植物体の葉を用いた。cDNA ライブラリーの作成方法としては、上記マングローブ
25 における方法と同じ方法を用いた。得られた cDNA ライブラリーは、それぞれ 10^5 から 10^6 の独立クローンを含んでいた。

実施例 2 耐塩性に関与する cDNA のスクリーニング条件の決定

マングローブ及びその他の塩生植物の cDNA ライブラリーの中から耐塩性に関与する cDNA のスクリーニング方法として、本発明者らは大腸菌の遺伝子発現系を利用した。即ち、大腸菌にマングローブ及びその
5 他、の塩生植物の cDNA を導入し、耐塩性が強化された形質転換大腸菌を選抜することで、耐塩性に関わる cDNA を獲得する新規な方法を開発した。耐塩性が強化された形質転換大腸菌の選抜には、適当な濃度の NaCl を含む 2YT 寒天培地を用いた。このスクリーニングを開始するにあたり、本発明者らは、上記のスクリーニングに適した宿主大腸
10 菌の選別を目的とし、各種大腸菌 (DH5 α , JM109, HB101, SOLR) の NaCl に対する最小生育阻害濃度を決定した。これらの大腸菌は周知の株であり、TOYOBO 社や Stratagene 社等から市販されているものである。DH5 α , JM109, 及び HB101 は 1200 mM の NaCl を含む 2YT 寒天培地上で、著しく生育が阻害されるもの
15 の、コロニー形成を行うことが可能であり、1500 mM の NaCl でその生育が完全に抑制される。これに対し、SOLR は 300 mM の NaCl で著しく生育が抑制され、400 mM の NaCl でその生育が完全に抑制される。このことから、SOLR は塩感受性の高い株であり、他の大腸菌と異なり、強力な耐塩性機構を持たないことが明らかとなった。
20 宿主大腸菌自身の耐塩性機構が強力に働かないことは、上記のスクリーニングを行う上で非常に有効である。よって、cDNA ライブラリーからの耐塩性に関与する cDNA のスクリーニングは、宿主大腸菌として SOLR を用い、選択寒天培地の NaCl 濃度を 400 mM に設定し、以下に示す手順でスクリーニングを行った。

25 実施例 3 マングローブ及びその他の塩生植物 cDNA ライブラリーからの耐塩性に関与する cDNA のスクリーニング

マングローブ及びその他の塩生植物の cDNA ライブラリーを *in vivo excision system* (Stratagene 社) により、pBluescript SK に組み込んだ形で SOLR に導入した。遺伝子導入は、ZAP-cDNA /Gigapack Cloning Kit (Stratagene 社) の手引き書に従って行なった。

- 5 マングローブ及びその他の塩生植物の cDNA が導入された SOLR の中から耐塩性関連の cDNA が導入された SOLR を選抜するために本発明では以下に示す 2 段階スクリーニングを行った。一次スクリーニングは、マングローブ及びその他の塩生植物の cDNA が導入された SOLR を 400 mM の NaCl、50 μ g/ml のカナマイシン、50 μ g/ml のアンピシリン、0.05 mM の IPTG を含む 2YT 寒天培地に植菌し、20 時間、37℃で培養した。この条件で得られたコロニー全てを再度、上記の寒天培地に植菌し、それらの生育を観察した。その結果、Bruguiera において、耐塩性が強化された 168 個のクローンを獲得した。その他の塩生植物の cDNA ライブラリーが導入された形質転換大腸菌においてもほぼ同数の耐塩性が強化されたクローンの獲得に成功した。これらのクローンの中には何らかの原因で宿主大腸菌由来の耐塩性機構が強化されている可能性が考えられたため、以下に示す二次スクリーニングを行った。
- 10
- 15

- 一次スクリーニングで得た各クローンからプラスミドを抽出し、これらを全て SOLR に再導入した。新たに得られた形質転換体は、50 μ g/ml のカナマイシン、50 μ g/ml のアンピシリン、0.05 mM の IPTG を含む 2YT 液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを 2YT 液体培地で希釈シリーズを作製し、上記の寒天選択培地に 25 μ l ずつスポットした。液体が乾くまで風乾した後、37℃で一晩培養した。この結果、Bruguiera cDNA ライブラリーにおいては 30 のクローンに明らかな耐塩性の向上が確認された。代表例として、配列番
- 20
- 25

号 1 に示した c D N A が導入された大腸菌のスポット実験の結果を図 1 に示す。次に、この 30 クローンに導入された c D N A の塩基配列を Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham 社) 及び D N A シーケンサー L I C - 4 0 0 0 L (L I - C O R) を用い、製造者の手
5 引き書に従って決定した。その結果、30 個のクローンから得られた Bruguiera c D N A は 7 種類に分類できた。即ち、配列番号 1 に示した c D N A を 23 個、配列番号 3 に示した c D N A を 1 個、配列番号 5 に示した c D N A を 2 個、配列番号 7 に示した c D N A を 2 個、配列番号 9 に示した c D N A を 1 個、配列番号 11 に示した c D N A を 1 個、配
10 列番号 13 に示した c D N A を 1 個獲得した。

また同様にして、アイスプラントからは配列番号 15, 17, 19, 35, 63 に示した c D N A を、シチメンソウからは配列番号 21, 37, 39, 51, 53, 57 に示した c D N A を、オカヒジキからは配列番号 23, 25, 41, 47, 49, 59, 61 に示した c D N A を、
15 ヒルギダマシからは配列番号 27, 29, 31, 33, 43, 45, 55 に示した c D N A を、それぞれ獲得した。

B L A S T 相同性検索プログラムを用い、これらの D N A がコードするアミノ酸配列の相同性検索を行った。その結果、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列は Swiss protein, P I R 等のデータベース中に相同性を有するタンパク質が登録されていないことから、新規のタンパク質と
20 考えられた。そこで、本願発明者らはこの c D N A がコードする新規のタンパク質 (総アミノ酸数、141) をマングリン (m a n g r i n)、この遺伝子を m a n g 1 と命名した。次に、マングリンの機能領域の決定を試みた。16, 42, 65, 87, 109, 142 番目のアミノ酸
25 に終止コドン、また、16, 35, 49 番目のアミノ酸にメチオニン (その直前に終止コドンを導入) を導入したサブクローンを作製し、これを

SOLRに導入して上記のスポット実験を行った結果、17から86番目のアミノ酸配列が耐塩性強化に関わる領域であることが明らかとなった(図2)。

配列番号4に示されるアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の t-complex polypeptide 1 (pir JN0448) と約90%の相同性を有した。

配列番号6に示されるアミノ酸配列は、*Ricinus communis* の Metallothionein-like protein TYPE 2 (EMBL L02306) と約80%の相同性を有した。配列番号8に示されるアミノ酸配列は *Homo sapiens* の RubB-like DNA helicase (AB024301) と約63%の相同性を有した。

10 配列番号10に示されるアミノ酸配列は *Rattus norvegicus* の Ribosomal protein S29 (pir S30298) 約45%の相同性を有した。配列番号12に示されるアミノ酸配列は *Zea mays* の Elongation factor eEF-1 alpha chain (pir S66339) と約90%の相同性を有した。配列番号14に示されるアミノ酸配列は *Schizosaccharomyces pombe* の cdc21 (pir

15 S26640) と約70%の相同性を有した。配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12又は14に示したタンパク質をそれぞれコードする配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11又は13に示されるcDNAは、実際に大腸菌の耐塩性を向上させる機能を有することから大腸菌等の原核生物から高等植物を含む幅広い生物群の耐塩性を強化する機能を有するものと考えられる。

20 また同様に、配列番号16に示されるアイスプラント由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の F13O11.15 gene product (gp AC006193_15) と68%の相同性を有した。配列番号18に示されるアイスプラント由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の H⁺-transporting ATPase (EC 3.6.1.35) 14K chain (pir T01087) と78%

25 の相同性を有した。配列番号20に示されるアイスプラント由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の 40S RIBOSOMAL PROTEIN S20

(pir T12992) と 91% の相同性を有した。配列番号 22 に示される
シチメンソウ由来のアミノ酸配列は *Atriplex canescens* の ozone-
inducible protein (prf 2316438B) と 63% の相同性を有した。配列
番号 24 に示されるオカヒジキ由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis*
5 *thaliana* の GIBBERELLIN-REGULATED PROTEIN 1 PRECURSOR
(sp GAS1_ARATH) と 58% の相同性を有した。配列番号 26 に示さ
れるオカヒジキ由来のアミノ酸配列は *Vigna unguiculata* の ADP-
ribosylation factor (gp AF022389_1) と 99% の相同性を有した。配
列番号 28 に示されるヒルギダマシ由来のアミノ酸配列は *Solanum*
10 *demissum* の tuberization-induced protein (prf 2310431A) と 56%
の相同性を有した。配列番号 30 に示されるヒルギダマシ由来のアミ
ノ酸配列は *Medicago sativa* の Enod93 protein (gp MSA248334_1) と
69% の相同性を有した。配列番号 32 に示されるヒルギダマシ由来の
アミノ酸配列は *Oryza sativa* の 40S RIBOSOMAL PROTEIN S21 (pir
15 S38357) と 69% の相同性を有した。配列番号 34 に示されるヒルギ
ダマシ由来のアミノ酸配列は *Mesembryanthemum crystallinum* の
protein phosphatase 2C homolog (AF097667) と 79% の相同性を有し
た。*Mesembryanthemum crystallinum* の protein phosphatase 2C
homolog (AF097667) と 79% の相同性を有した。

20 また、配列番号 36 に示されるアイスプラント由来のアミノ酸配列は
Ribes nigrum の pRIB5 protein (gp RNI7578_1) と 58% の相同性を
有した。配列番号 38 に示されるシチメンソウ由来のアミノ酸配列は
Mesembryanthemum crystallinum の tonoplast intrinsic protein (pir
T12439) と 84% の相同性を有した。配列番号 40 に示されるシチメ
25 ンソウ由来のアミノ酸配列は *Spinacia oleracea* の
phosphoethanolamine N-methyltransferase (gp AF237633_1) と 8

6 %の相同性を有した。配列番号 4 2 に示されるオカヒジキ由来のアミノ酸配列は *Selenicereus wittii* の phosphoenolpyruvate carboxylase (gpu SWI17843_1) と 8 3 %の相同性を有した。配列番号 4 4 に示されるヒルギダマシ由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の putative chaperonin (gp ATAC021640_16) と 8 4 %の相同性を有した。配列番号 4 6 に示されるヒルギダマシ由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の hypothetical protein T5F17.40 (pir T10653) と 8 8 %の相同性を有した。

また、配列番号 4 8 に示されるオカヒジキ由来のアミノ酸配列は Glycine max の cysteine proteinase inhibitor (pir T07139) と 6 3 %の相同性を有した。配列番号 5 0 に示されるオカヒジキ由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の nucleotide sugar epimerase-like protein (gp ATCHRIV73_7) と 8 7 %の相同性を有した。配列番号 5 2 に示されるシチメンソウ由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の putative protein (gp ATT20K12_12) と 5 7 %の相同性を有した。配列番号 5 4 に示されるシチメンソウ由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の putative WD-40 repeat protein (gp AC006569_14) と 7 8 %の相同性を有した。配列番号 5 6 に示されるヒルギダマシ由来のアミノ酸配列は *Medicago sativa* の cdc2MsE gene product (gp MSCDC2MSE_1) と 7 5 %の相同性を有した。配列番号 5 8 に示されるシチメンソウ由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の putative protein (gp ATF17C15_9) と 3 9 %の相同性を有した。配列番号 6 0 に示されるオカヒジキ由来のアミノ酸配列は *Nicotiana tabacum* の transcription factor E2F (prf 2601241A) と 6 6 %の相同性を有した。配列番号 6 2 に示されるオカヒジキ由来のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の hypothetical protein T26B15.5 (pir T02548)

と 3 4 % の相同性を有した。配列番号 6 4 に示されるアイスプラント由来のアミノ酸配列は Homo sapiens の Homo sapiens cDNA FLJ10298 fis, clone NT2RM1001115, weakly similar to ENDOCHITINASE 2 PRECURSOR (EC 3.2.1.14) (pir T02548) と 3 0 % の相同性を有した。

5 実施例 4 酵母におけるマングローブ c D N A の効果

配列番号 1 に示した c D N A がクローニングされた pBluescript SK を制限酵素 EcoRI, NotI で切断し、これをアガロースゲル電気泳動した。ここで得られた約 1 k b の断片を切り出し、GENECLEAN Kit (B I O 1 0 1 社) で精製した。これを Ligation Kit ver2 (宝酒造) を用い、制限酵素 EcoRI, NotI で切断した、酵母発現ベクター p Y E S 2 (Invitrogen) に導入した。次に、これをエレクトロポレーション法により酵母に導入した。酵母は Saccharomyces cerevisiae YM4271 (C l o n t e c h 社) を使用した。形質転換酵母の選択にはウラシルを含まない S D 寒天培地 (以下、- U r a S D 寒天培地) を用いた。形質転換酵母の耐塩性の評価は以下のように行った。対数増殖期後期まで - U r a S D 培地で培養した形質転換酵母を 1 2 0 0 m M の N a C l を含む - U r a S D 培地、及び N a C l を含まない - U r a S D 培地に植菌 (初期濃度 O D 6 0 0 = 0 . 1) し、3 0 ° C で振とう培養を開始した。2 4 時間ごとに細胞懸濁液を採取し、その吸光度を測定した。吸光度の測定には島津製作所の U V - 1 2 0 0 を利用した。比較としてベクターである p Y E S 2 のみを導入した酵母についても同様な検討を行った。その結果を図 3 に示した。図 3 から明らかなように、スクリーニングの結果得られた c D N A は酵母においても、大腸菌の場合と同様に耐塩性を強化する機能を有することが確認された。

25 実施例 5 タバコ培養細胞におけるマングローブ c D N A の効果

配列番号 1 に示した c D N A がクローニングされている p B l u e s

c r i p t S Kを制限酵素 X b a 1, X h o 1で切断し、これをアガロースゲル電気泳動した。ここで得られた約 1 k bの断片を切り出し、GENECLEAN Kit (B I O 1 0 1) で精製した。これを Ligation Kit ver2 (宝酒造社) を用い、植物発現ベクター p B I 1 0 1 (EMB0J Vol6, p3901-3907(1987)) の制限酵素 EcoRI, NotI サイトに導入した。得られたプラスミドをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに導入し、これをタバコ培養細胞 (Nicotiana tabacum L. Cv. Bright Yellow 2) に感染させた。アグロバクテリウムを用いた植物細胞への遺伝子導入法は周知の方法である。ここでは、アグロバクテリウムに Agrobacterium tumefaciens EHA 101 を用い、An の方法 (Plant Physiol Vol. 79, p568-570(1985)) に従った。形質転換タバコ培養細胞の耐塩性の評価は以下のように行った。形質転換タバコ培養細胞のカルスを拾い、L i n s - M a y e r 培地で対数増殖期後期まで培養した。これを N a C l 濃度 0, 1 0 0, 及び 1 5 0 m M となるように調整した 4 5 m l の L i n s - M a y e r 培地にそれぞれ 1 m l の割合で植え継ぎ、2 6 ° C で振とう培養を開始した。培養開始後、7 日または 1 3 日目の細胞懸濁液から細胞を回収し、その湿重量を測定した。比較として、マングローブ c D N A のかわりに、p B I 1 0 1 を用いて G U S 遺伝子を導入したタバコ培養細胞についても同様な検討を行った。その結果を図 4 に示す。図 4 から明らかなように、スクリーニングの結果得られた c D N A はタバコ培養細胞においても大腸菌の場合と同様に、耐塩性を強化する機能を有することが確認された。

実施例 6 タバコ (植物体) におけるマングローブ c D N A の効果

実施例 5 で得られたプラスミドをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに導入し、これをタバコリーフディスクに感染させた。アグロバクテリウムを用いたタバコリーフディスクへの遺伝子導入法は

周知の方法である。ここでは、アグロバクテリウムに *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 を用い、植物細胞工学入門（学会出版センター（1998））記載の方法に従った。形質転換タバコ（植物体）の耐塩性の評価は以下のように行った。形質転換タバコを NaCl 濃度 150 mM となるように調整した MS 寒天培地に植え継ぎ、26℃、明暗周期の光照射下（明：16時間／暗：8時間）で培養した。培養開始30日後の植物体の生育を観察し、その耐塩性を評価した。マングローブ cDNA のかわりに、pBI101 を用いて GUS 遺伝子を導入したタバコ培養細胞についても同様な検討を行った。その結果を図5に示す（参考写真参照）。図5からも明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA を導入したタバコ植物体は、NaCl 存在下においても根、葉、茎の生長が良好であった。このことから、スクリーニングの結果得られた cDNA は植物体レベルにおいても耐塩性強化機能を有することが確認された。

15 実施例7 各種環境ストレスに対するマングローブ cDNA の効果

（1）熱ストレス

配列番号1に示した cDNA がクローニングされている pBluescript SK が導入された SOLR を 50 μ g/ml のカナマイシン、50 μ g/ml のアンピシリン、0.05 mM の IPTG を含む 2YT 液体培地で 37℃、および 40℃ で培養した。対照としてベクターである pBluescript SK が導入された SOLR についても同様な検討を行った。その結果を図6に示した。図6からも明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA は耐熱性を強化する機能を有することが確認された。

25 （2）浸透圧ストレス

配列番号1に示した cDNA がクローニングされている pBluescript

SK が導入された SOLR を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、 0.05 mM の IPTG を含む 2YT 液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを 2YT 液体培地で希釈シリーズを作製し、 800 mM の 2YT 寒天選択培地に $25 \mu\text{l}$ ずつスポットした。液体が乾くまで風乾した後、 37°C で一晩培養した。その結果を図 7 に示した。図 7 から明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA は浸透圧耐性を強化する機能を有することが確認された。

(3) 凍結ストレス

配列番号 1 に示した cDNA がクローニングされている pBluescript SK を導入した SOLR を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、 0.05 mM の IPTG を含む 2YT 液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを 2YT 液体培地で $5000 \text{ cells}/25 \mu\text{l}$ になるように希釈した。これをプラスチックチューブに移し、3 分間の液体窒素による凍結と 37°C 、10 分間の融解を繰り返した。融解時の菌体懸濁液の一部 ($25 \mu\text{l}$) を採取し、SOLR を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、 0.05 mM の IPTG を含む 2YT 寒天培地にスポットした。比較としてベクターである pBluescript SK が導入された SOLR についても同様な検討を行った。その結果を図 8 に示した。図 8 から明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA は凍結ストレスに対する耐性を強化する機能を有することが確認された。

実施例 8 環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の分子進化

図 2 に示した、マングリン cDNA の最小機能領域と考えられる領域 (アミノ酸番号: 17-86) がクローニングされたプラスミドを鋳型とした PCR を行うことにより、マングリン最小機能領域と考えられる領域 (mangrin core) にランダムな変異の導入を試みた。プライマーに

は、配列番号 65 で示される 5' - GCTCTGAGAACCGTCTAGACTTAGATGAAGGTG
- 3' 及び配列番号 66 で示される 5' -
TCTCTCGTTCATCTCGAGCTATTACAGCTC- 3' を用いた。これらのプライマー
は、mangrin core を開始コドン及び終止コドン、さらにその外側に制限
5 酵素 (XbaI, XhoI) サイトを付加したかたちで増幅できるように設計
したものである。PCR には、DNA ポリメラーゼとして、Takara Taq (Mg²⁺ free buffer) (宝酒造) を用いた。PCR 反応液は、添付のバッ
ファーに対し、MgCl₂ を 1.0 mM、MnCl₂ を 0.5 mM、d
NPT Mixture を 0.25 mM となるように添加し、これに各プライ
10 マーをそれぞれ、2 pmol / 10 µl、テンプレート DNA を 10 pg / 10 µl となるように加えた。反応の温度条件は 92℃ を 30 秒、
50℃ を 30 秒、72℃ を 90 秒とし、このサイクルを 30 回繰り返す
ことで、mangrin core にランダムな変異が導入された DNA 断片を得
た。得られた DNA 断片を XbaI 及び XhoI で切断し、これをあらかじめ
15 XbaI 及び XhoI で切断したベクター (pBluescript SK) にクローニング
した。これを SOLR に導入し、450 mM の NaCl を含む寒天培地
上での生育を指標とした選抜を行い、塩基配列に変異が生じているにも
かかわらず、耐塩性向上活性が維持、もしくは強化された変異 mangrin
core を選抜した。得られたクローン一部について塩基配列の決定し、
20 スポットテストにて耐塩性向上活性を評価した。その結果、図 9 に示す
ように、2 クローン (c-52, c-80) の塩基配列に変異が生じて
いることが明らかになった。このうち、c-80 はアミノ酸配列に変異
が生じており、これが mangrin core の耐塩性強化機能を高める要因に
なっていると考えられた。また、塩ストレス耐性強化機能の比較を示す
25 図 10 から明らかなように、環境ストレス耐性遺伝子の機能向上にも
利用できることがわかった。

産業上の利用可能性

- 本発明は、各種生物の環境ストレスに対する耐性を強化する有効な手段になる。特に環境ストレス耐性が強化された植物はこれまで生育が困難であった塩害土壌、寒冷地、砂漠、海洋での生育が促進され、これにより、農地の拡大による農産物生産の増加が期待できる。また、環境ストレス耐性が強化された植物は、緑地環境の増大や砂漠緑化につながると同時に、地球規模においてCO₂濃度の増大による地球温暖化現象の抑制に貢献するものである。
- 5

請 求 の 範 囲

1. 環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAをスクリーニングする方法であって、cDNAライブラリー由来の候補
- 5 cDNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補cDNAを単離することを特徴とするスクリーニング方法。
2. 環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA
- 10 をスクリーニングする方法であって、cDNAライブラリー由来の候補cDNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補cDNAを単離し、単離された候補cDNAにランダムな変異を導入し、この変異cDNAを
- 15 宿主細胞に導入し、変異前のcDNAの選択条件より厳しい条件下で選抜する工程を1又は2回以上繰り返すことを特徴とするスクリーニング方法。
3. 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射
- 20 線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項1又は2記載のスクリーニング方法。
4. 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項3記載のスクリーニング方法。
5. 宿主細胞が、大腸菌であることを特徴とする請求項1～4のいずれ
- 25 か記載のスクリーニング方法。
6. 大腸菌が、SOLR株であることを特徴とする請求項5記載のスク

リーニング方法。

7. 宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下が、350 mM以上の塩濃度の条件下であることを特徴とする請求項1～6記載のスクリーニング方法。

5 8. 請求項1～7のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とする環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

9. 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射
10 線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項8記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

10. 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項
15 9記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

11. 環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質が、植物由来のタンパク質であることを特徴とする請求項8～10のいずれか記載の環境
ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

12. 植物が、オヒルギ (*Bruguiera sexangla*)、ヒルギダマシ
20 (*Avicennia marina*)、シチメンソウ (*Suaeda japonica*)、オカヒジキ (*Salsola komarovii*) 又はアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) であることを特徴とする請求項11記載の環境ストレス
耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

13. 以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

25 (a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

(c)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

14. 配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

15. 請求項14記載のDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

16. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

15 (b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

17. 配列番号3に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

20 18. 請求項17記載のDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

19. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

25 (a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のア

ミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

20. 配列番号5に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

- 5 21. 請求項20記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

22. 以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

- 10 (a)配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

23. 配列番号7に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

15

24. 請求項23記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

25. 以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

20

(a)配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号10に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

- 25 26. 配列番号9に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

27. 請求項26記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

5 28. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

10 29. 配列番号11に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

30. 請求項29記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

15 31. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号14に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
20 少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

32. 配列番号13に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

33. 請求項32記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を
25 有するタンパク質をコードするDNA。

34. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA

A。

(a)配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
5 少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

3 5. 配列番号 1 5 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

3 6. 請求項 3 5 記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を
10 有するタンパク質をコードするDNA。

3 7. 以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
15 少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

3 8. 配列番号 1 7 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

3 9. 請求項 3 8 記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を
20 有するタンパク質をコードするDNA。

4 0. 以下の(a)～(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
25

少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

4 1. 配列番号 1 9 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA。

4 2. 請求項 4 1 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA。

4 3. 以下の (a)~(b) のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA。

(a) 配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

10 (b) 配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

4 4. 配列番号 2 1 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA。

15 4 5. 請求項 4 4 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA。

4 6. 以下の (a)~(b) のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA。

20 (a) 配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

4 7. 配列番号 2 3 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA。

4 8. 請求項 4 7 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな

条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

49. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

5 (a)配列番号26に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号26に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

50. 配列番号25に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

51. 請求項50記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

52. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号28に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号28に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

53. 配列番号27に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

54. 請求項53記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

55. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号30に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号30に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

5 56. 配列番号29に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

57. 請求項56記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

10 58. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号32に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号32に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
15 少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

59. 配列番号31に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

60. 請求項59記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を
20 有するタンパク質をコードするDNA。

61. 以下の(a)~(b)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号34に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号34に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
25 少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

6 2. 配列番号 3 3 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA。

6 3. 請求項 6 2 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA。

6 4. 以下の (a) ~ (b) のいずれか記載のタンパク質をコードする DNA。

(a) 配列番号 3 6, 3 8, 4 0, 4 2, 4 4, 4 6, 4 8, 5 0, 5 2, 5 4, 5 6, 5 8, 6 0, 6 2 又は 6 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 3 6, 3 8, 4 0, 4 2, 4 4, 4 6, 4 8, 5 0, 5 2, 5 4, 5 6, 5 8, 6 0, 6 2 又は 6 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

6 5. 配列番号 3 5, 3 7, 3 9, 4 1, 4 3, 4 5, 4 7, 4 9, 5 1, 5 3, 5 5, 5 7, 5 9, 6 1 又は 6 3 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む DNA。

6 6. 請求項 6 5 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA。

6 7. 請求項 8 ~ 6 6 のいずれか記載の DNA を用いることを特徴とする環境ストレス耐性の向上方法。

6 8. 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上のストレス

であることを特徴とする請求項 6 7 記載の環境ストレス耐性の向上方法。

6 9. 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項 6 8 記載の環境ストレス耐性の向上方法。

7 0. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

- 5 7 1. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と相同性が 7 0 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

- 7 2. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
10 少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

7 3. 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

7 4. 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

- 15 7 5. 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

7 6. 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

7 7. 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

- 20 7 8. 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

7 9. 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

- 25 8 0. 配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

- 8 1. 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- 8 2. 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。
- 5 8 3. 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- 8 4. 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。
- 8 5. 配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- 10 8 6. 配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。
- 8 7. 配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- 8 8. 配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個
- 15 のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。
- 8 9. 配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- 9 0. 配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
- 20 少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。
- 9 1. 配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- 9 2. 配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ
- 少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。
- 25 9 3. 配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- 9 4. 配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個

のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

95. 配列番号26に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

96. 配列番号26に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個
5 のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

97. 配列番号28に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

98. 配列番号28に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個
10 のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

99. 配列番号30に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

100. 配列番号30に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個
 のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

15 101. 配列番号32に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

102. 配列番号32に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個
 のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

103. 配列番号34に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

20 104. 配列番号34に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個
 のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

105. 配列番号36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62又は64に示されるアミノ酸配列
25 からなるタンパク質。

106. 配列番号36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50,

5 2, 5 4, 5 6, 5 8, 6 0, 6 2 又は 6 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

5 1 0 7. 請求項 7 0 ~ 7 2 のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

1 0 8. 請求項 7 3 ~ 1 0 4 のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

1 0 9. 請求項 1 0 5 又は 1 0 6 記載のタンパク質に特異的に結合する
10 抗体。

1 1 0. 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 0 7 ~ 1 0 9 のいずれか記載の抗体。

1 1 1. 請求項 8 ~ 1 2 のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA を含むことを特徴とするベクター。

15 1 1 2. 請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか記載の DNA を含むことを特徴とするベクター。

1 1 3. 請求項 1 6 ~ 6 3 のいずれか記載の DNA を含むことを特徴とするベクター。

1 1 4. 請求項 6 4 ~ 6 6 のいずれか記載の DNA を含むことを特徴と
20 するベクター。

1 1 5. 請求項 1 1 1 ~ 1 1 4 のいずれか記載のベクターを宿主細胞に導入することにより得られることを特徴とする形質転換細胞。

1 1 6. 宿主細胞が、植物細胞であることを特徴とする請求項 1 1 5 記載の形質転換細胞。

25 1 1 7. 請求項 1 1 5 又は 1 1 6 記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞又はその培養液の上清から組換えタンパク質を回収することを

特徴とする環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の製造方法。

118. 請求項8～12のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とする
5 トランスジェニック植物。

119. 請求項13～15のいずれか記載のDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物。

120. 請求項16～63のいずれか記載のDNAを植物細胞に導入し、
10 該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物。

121. 請求項64～66のいずれか記載のDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物。

122. 請求項111～114のいずれか記載のベクターを植物細胞に
15 導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物。

123. 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、
20 放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項118～122のいずれか記載のトランスジェニック植物。

124. 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項123記載のトランスジェニック植物。

125. 請求項118～122のいずれか記載のトランスジェニック植物に由来することを特徴とする繁殖材料。

THIS PAGE BLANK (USPTO)